

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3337 669 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 33 37 669.7
㉑ Anmeldetag: 17. 10. 83
㉒ Offenlegungstag: 2. 5. 85

㉓ Int. Cl. 3:
B01 D 13/02
C 07 G 7/00
C 08 J 5/18
C 07 H 21/00

DE 3337 669 A 1

㉔ Anmelder:
Carl Schleicher & Schuell GmbH & Co KG, 3352
Einbeck, DE

㉕ Erfinder:
Clad, Andreas, Dr., 7800 Freiburg, DE

Behördeneigentlich

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉖ **Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle**

Elektroelutionsgerät zum Betrieb in einer Elektrophorese-
kammer und zur Elektroelution von biologischen Makromo-
lekülen aus Elektrophoresegeleabschnitten, bei der die zu elu-
ierenden Makromoleküle nicht in einem Gel zwischenadsor-
biert, sondern zwischen zwei Polymermembranen in einer
Falle gesammelt und aus dieser abpipettiert werden können.
Dabei ist die in Richtung der Wanderung der Makromoleküle
erste oder innere Membran unter der Einwirkung des elektri-
schen Feldes für die Makromoleküle durchlässig, während
unter gleichen Bedingungen die in Wanderungsrichtung
zweite Membran, nämlich die äußere Membran des Elek-
troelutionsgerätes, für die Makromoleküle undurchlässig ist.
Nach Abschalten des elektrischen Feldes sind beide Mem-
branen für jeden Stofftransport zumindest im wesentlichen
undurchlässig.

DE 3337 669 A 1

Carl Schleicher & Schuell GmbH & Co. KG
Grimsehlstraße 23, 3352 Einbeck

Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle

A n s p r ü c h e

1. Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle, bestehend aus einem quaderförmigen oder scheibenförmigen Körper, in dem mindestens ein von einer Seite des Körpers zur gegenüberliegenden Seite des Körpers durchgehender und an beiden Seiten offener Kanal ausgebildet ist, der zumindest im wesentlichen in der oder parallel zur Hauptebene des Körpers verläuft, der zumindest teilweise nach oben offen ist und in dem im Bereich zumindest eines seiner beiden Enden quer zur Längsachse des Kanals hintereinanderliegend zwei Begrenzungsflächenelemente vorgesehen sind, die zwischen sich einen als Falle für die Makromoleküle dienenden Kanalabschnitt definieren, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Begrenzungsflächenelemente Polymermembranen (M1, M2) sind, daß die äußere Membran (M1) in Gegenwart eines elektrischen Feldes für Wasser und kleine Ionen und Moleküle durchlässig, für die zu eluierenden Makromoleküle jedoch undurchlässig ist,

während die innere Membran (M2) in Gegenwart eines elektrischen Feldes für alle Ionen und Moleküle, also auch für die zu eluierenden Makromoleküle, durchlässig ist, und daß beide Polymermembranen (M1, M2) in Abwesenheit eines einwirkenden elektrischen Feldes für alle Ionen und Moleküle, also insbesondere auch für Wasser und Puffer, undurchlässig sind.

2. Gerät nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß an beiden Endbereichen des Kanals (17) Membranfallen (2) vorgesehen sind, so daß in der Mitte des Kanals (17) zwischen den beiden einander gegenüberliegenden inneren Membranen (M2) eine separate Elutionskammer (18) ausgebildet ist.
3. Gerät nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymermembranen (M1, M2) von Wasser und den verwendeten Pufferlösungen benetzbar sind.
4. Gerät nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymermembranen (M1, M2) im wesentlichen aus Cellulose, Cellulosederivaten, Polyamiden, Polyimiden oder Polysulfonen bestehen.
5. Gerät nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die äußere Membran (M1) eine Membran auf Celluloseacetatbasis und die innere Membran (M2) eine Membran auf der Basis von regenerierter Cellulose ist.

6. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß zumindest ein Teil der Membranen austauschbar durch
Öffnungen (5) oder in Führungsschlitze (13) von oben her in
den Körper (1) bzw. in den Kanal (17) einsetzbar oder ein-
steckbar sind.
7. Gerät nach Anspruch 6,
gekennzeichnet durch
zumindest eine Membran (M2), die in einem im Elutionsmedium
quellbaren Rahmen gehalten ist, der in trockenem und unge-
quollenem Zustand paßgenau in eine in allen Kanalwänden
(14,15,16) in der Membranebene ausgebildete Schlitznut (13)
einsteckbar ist.
8. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Falle (2) außen durch eine aus dem Körper (1) ausge-
formte undurchlässige Trennwand (3) begrenzt ist, die eine
Öffnung (4) oder Bohrung aufweist, deren freier Durchgang von
außen durch die äußere Membran (M1) abgedeckt ist, die von
einem nach axial innen vorgespannten oder beaufschlagten
Rahmen (8) dichtend vor die Öffnung (4) in der Trennwand
(3) gepreßt wird.
9. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Falle (2) nach oben offen ist und ein Volumen im
Mikroliterbereich hat, während die Elutionskammer (18) ein
Volumen im Bereich von einigen zehn Millilitern hat.

10. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Rahmen (8) durch eine Spannhülse (7), ins-
besondere Gewindehülse, gegen die Trennwand (3) ge-
zwungen wird und im Rahmen (8) und der Hülse (7)
gemeinsam ein Kanal (21) ausgebildet ist,
der sich stufenlos konisch nach außen öffnet.
11. Verwendung des Gerätes nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur
Elektroelution aus Elektrophoresegelelen, zum Konzentrieren
und zum Entsalzen oder Umpuffern von biologischen Makro-
molekülen, sowie zum Konzentrieren und Abtrennen von
positiv geladenen Proteinen.

JAEGER & PARTNER
PATENTANWÄLTE

SLS-90

Carl Schleicher & Schuell GmbH & Co. KG
Grimsehlstraße 23, 3352 Einbeck

Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle der im Oberbegriff des Anspruchs 1 genannten Art.

Speziell betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Elektroelution in aller Regel elektrisch geladener biologischer Makromoleküle aus Elektrophoresegelen.

Ein Gerät dieser Art ist aus Analytical Biochemistry 124, 299 bis 302 (1982) bekannt. Das bekannte Gerät ist ein scheibenförmiger Quader aus Polyacrylglas, in dem mehrere parallel zueinander verlaufende Elutionskanäle in Form von U-Rinnen ausgebildet sind, die sich von einer Seite des Quaders bis zur gegenüberliegenden Seite durchgehend und nach oben offen erstrecken. An einem Endbereich jedes der Elutionskanäle sind beutelartig Nylongaze eingefügt, die nach Art eines Filters gegen die Kanalwände hermetisch abgedichtet und mit einem Adsorptionsgel für die Makromoleküle, beispielsweise DNA, RNA, Proteine oder Lipopolysaccharide, gefüllt ist.

Das Problem der Elektroelution stellt sich bei der Aufarbeitung der Elektrophoresegele, in denen Makromoleküle gebräuchlicherweise fraktioniert werden. Das mit der Zielfraktion beladene Stück Elektrophoresegel wird ausgeschnitten und in den Kanal des Elektroelutionsgerätes eingelegt. Das Gerät wird dann in eine horizontale Elektrophoresekammer in der Weise eingesetzt, daß das elektrische Feld, das in der Elektrophoresekammer erzeugbar ist, parallel zum Elutionskanal des Elektroelutionsgerätes verläuft. Anschließend wird die Elektrophoresekammer so hoch mit Puffer gefüllt, daß die zwischen den zueinander parallel verlaufenden Kanälen stehenden Trennwände gerade nicht überspült werden. Bei Einschalten des elektrischen Feldes wandern die elektrisch geladenen biologischen Makromoleküle aus dem im Puffer liegenden Elektrophoresegel und werden in dem im Nylonbeutel vorgelegten Adsorptionsgel aufgefangen. Nach Abschluß der Elution wird das Elutionsgel aus den Nylonbeuteln entnommen und auf der Säule aus diesem Adsorptionsgel eluiert, und zwar bei Verwendung des gebräuchlichen Malachitgrüngels in aller Regel mit einer einmolaren Natriumperchloratlösung.

Der Gesamtvorgang dieses Verfahrens, das derzeit das beste nach dem Stand der Technik bekannte Verfahren ist, benötigt pro Elektrophoresegelstück ungefähr 40 min und ist durch das wiederholte Adsorbieren und Eluieren mit spürbaren Verlusten an Zielsubstanz verbunden. Selbst bei Außerachtlassung bakterieller Verluste muß bei diesem Elutionsverfahren mit einem Gesamtverlust an Zielsubstanz von mindestens ungefähr 25 %, d.h. kann also höchstens mit einer Ausbeute von ungefähr 75 %, bezogen auf das Gewicht der Makromoleküle im vorgelegten Elektrophoresegelstück, gerechnet werden. Zudem sind die Kosten für das Zwischenadsorptionsgel beachtlich. So beträgt der Handelspreis für 25 ml Malachitgrüngel beispielsweise rund DM 350,--.

Angesichts dieses Standes der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Gerät zur Elektroelution elektrisch geladener Makromoleküle, insbesondere biologischer Makromoleküle zu schaffen, das eine rasche, verlustfreie und kostengünstige Elution von Makromolekülen erlaubt, insbesondere aus Elektrophoresegelelen. Dabei sollen im Sinne dieser Aufgabe und im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "Eluieren" bzw. "Elektroelution" auch das "Eluieren" der Makromoleküle aus flüssigen Phasen unter der Einwirkung eines elektrischen Feldes verstanden werden, insbesondere also ein Konzentrieren von Lösungen, ein Entsalzen oder ein Umpuffern.

Zur Lösung dieser Aufgabe schafft die Erfindung ein Gerät zur Elektroelution, bei dem gemäß den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 genannten Merkmalen die Falle für die Ziel-Makromoleküle durch zwei Polymermembranen begrenzt bzw. gebildet wird. Von diesen beiden Membranen ist, bezogen auf die Längsachse des Elutionskanals, die äußere Membran in Gegenwart eines elektrischen Feldes für kleine Ionen und Moleküle, insbesondere für Puffer und Wasser, durchlässig, für die zu eluierenden Makromoleküle jedoch undurchlässig. Die in diesem Sinne innere Membran ist dagegen für alle Ionen und Moleküle, also insbesondere auch für die zu eluierenden Makromoleküle durchlässig, wenn sie in einem elektrischen Feld liegt. Bei abgeschaltetem elektrischen Feld sind dagegen beide Membranen für alle Ionen und Moleküle gleich welcher Größe undurchlässig, sind also insbesondere praktisch wasserdicht. Bei aufgefülltem Elektroelutionsmedium und eingeschaltetem elektrischen Feld werden also die Makromoleküle aus dem beispielsweise vorgelegten Elektrophoresegelstück herausgezogen, wandern in Richtung des elektrischen Feldes, in aller Regel auf den positiven Pol zu, durch die innere Membran hindurch und werden auf der Innenseite der äußeren Membran festgehalten und gesammelt, also konzentriert, während die Pufferionen durch diese Membran hindurch in die Elektrophoresekommer hineinwandern.

In der Elektrophoresekammer wird das Gerät gemäß der Erfindung in gleicher Weise wie das eingangs beschriebene bekannte Gerät, zum Betrieb eingesetzt. Nach Abschluß des Elutionsvorganges wird das elektrische Feld kurzfristig vorzugsweise 10 bis 15 s, umgepolt, so daß die auf der Innenfläche der äußeren Membran gesammelten und ggf. zum Teil auch adsorbierten Makromoleküle von der Membranoberfläche abgelöst und in den Fallenraum hinein freigegeben werden.

Mit diesem Gerät wird für die Elektroelution eines Elektrophoresegelstücks eine Zeit von nicht mehr als 5 min benötigt. Dabei beträgt die Ausbeute an eluierten Makromolekülen mindestens 90 % und bis zu praktisch 100 %. Diese Ausbeute kann dadurch erzielt werden, daß als innere Membran eine Membran eingesetzt wird, die wasserdicht und damit also zusätzlich bakteriendicht ist, d.h. also keine Bakterien aus dem Elutionskanal oder der Elutionskammer in die Falle übertreten läßt. Wenn die Falle zuvor sorgfältig sterilisiert wurde, kann auf diese Weise ein Verlust an Makromolekülen durch Bakterienfraß, der bei allen bekannten Elektroelutionsverfahren erhebliche Ausmaße annehmen kann, ausgeschaltet werden.

Membranen, die die vorstehend genannten Anforderungen erfüllen, sind in großer Vielfalt und in den verschiedensten Ausbildungen im Handel erhältlich. Vorzugsweise werden Polymermembranen verwendet, die auf Basis von Polymeren aufgebaut sind, die von Wasser und den verwendeten Pufferlösungen benetzt werden können, wie insbesondere Cellulose, Cellulose-derivate, Polyamide, Polyimide und Polysulfone. Vorzugsweise verwendet man für die äußeren Membranen solche aus Celluloseacetaten und für die inneren Membranen solche aus regenerierter Cellulose. Solche Membranen sind beispiels-

weise von der Anmelderin unter den Typenbezeichnungen RAB oder RCB für die äußere Membran und RSB für die innere Membran erhältlich. Die hier verwendbaren Cellulosemembranen sind jedoch auch von jedem anderen Hersteller in großer Auswahl beziehbar. Dabei sollte die innere Membran eine mittlere Porengröße im Bereich von ungefähr $\approx 0,2 \mu\text{m}$ aufweisen, insbesondere eine Porengröße im Bereich von $0,05$ bis $0,20 \mu\text{m}$ haben, und sollte die äußere Membran für Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von größer als ungefähr 1000 undurchlässig sein. Dabei versteht sich jedoch von selbst, daß solche Angaben lediglich als Richtwerte zu betrachten sind, die der Anwender nach Maßgabe der jeweils zu lösenden Aufgabe ohne weiteres abändern kann und wird.

Nach einer Ausgestaltung der Erfindung sind die durch die jeweils innere und jeweils äußere Membran gebildeten Makromolekülfallen an beiden Endbereichen des durchgehend offenen Elutionskanals vorgesehen, so daß zwischen den beiden einander gegenüberliegenden jeweils inneren Membranen eine separate Elutionskammer entsteht. Dies ermöglicht, daß in der Elutionskammer mit einer anderen Pufferlösung als in der Elektrophoresekammer gearbeitet wird, in der das Gerät gem. der Erfindung betrieben wird. Dadurch wird die Möglichkeit zur Entsalzung oder Umpufferung der Makromoleküllösung eröffnet.

Die Membranen sind vorzugsweise austauschbar im Körper des Gerätes gehalten. Die Austauschbarkeit ist dabei insbesondere durch ein Einstecken oder Einschieben von oben her in entsprechende Führungen oder Ausnehmungen des Gerätekörpers durchführbar. Vor allem für die innenliegenden Membranen hat es sich dabei als bequem, praktisch und hundertprozentig zuverlässig erwiesen, wenn die innere Membran mit einem Rahmen aus quellfähigem Werkstoff umgeben ist, wobei dieser Rahmen im trockenen und ungequollenen Zustand paßgenau in eine nach oben offene U-förmige

Schlitzführung einschiebbar ist. Nach dem Auffüllen der Elutionskammer mit Elutionsmedium bzw. nach dem Einsetzen des Gerätes in die horizontale Elektrophoresekammer umspült das Elutionsmedium den Rahmen und läßt diesen aufquellen, so daß die innere Membran wie ein Filter dicht in die Kanalwände eingespannt ist.

Die äußere Membran, die auch ungerahmt verwendet werden kann, liegt vorzugsweise von außen her an einer Trennwand an, die die Falle nach axial außen begrenzt. In dieser massiven Trennwand ist eine zentrale Bohrung für den Ionenstromdurchgang vorgesehen, die durch die Membran abgedeckt wird. Dabei wird die Membran

durch einen Rahmen gegen die Trennwand und über das Loch gespannt bzw. gepreßt, der seinerseits nach axial innen, bezogen auf den Kanal des Gerätes, beaufschlagt ist, beispielsweise durch eine Druckfeder oder eine Spannschraube oder Spannschraubenhülse. Dabei kann die Abdichtung der äußeren Membran gegen diese Trennwand zusätzlich durch einen oder mehrere Dichtungsringe oder Dichtungskanten verbessert werden. Dabei ist in dem Rahmen und in der Spannschraubenhülse vorzugsweise ein stufenloser Kanal ausgebildet, der sich konisch nach außen öffnet, um die Bildung von Gasblasen zu vermeiden.

Der Körper des Gerätes gem. der Erfindung ist vorzugsweise aus einem inerten Kunststoff hergestellt, beispielsweise aus einem Polycarbonat oder aus einem Acrylglas. Der Kunststoff ist vorzugsweise autoklavierbar.

Die Erfindung ist im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels in Verbindung mit den Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1

in Draufsicht ein Ausführungsbeispiel des Elektroelutionsgerätes ohne Membranen;

Fig. 2

einen Schnitt nach II-II in Fig. 1;

Fig. 3

eine schematische Darstellung zur Wirkungsweise des in den Figuren 1 und 2 gezeigten Gerätes;

Fig. 4

ein weiteres Ausführungsbeispiel des Elektroelutionsgerätes in Teildarstellung und in Draufsicht;

und

Fig. 5

das in Fig. 4 gezeigte Gerät im Axialschnitt.

In der Fig. 1 ist in Draufsicht ein Ausführungsbeispiel des Elektroelutionsgerätes gem. der Erfindung, genauer gesagt der Körper 1 eines solchen Gerätes, dargestellt. Die Fig. 2 zeigt dieses Ausführungsbeispiel im Axialschnitt, wobei in der Darstellung der Fig. 2 auf der linken Seite die äußere Membran M1 und die innere Membran M2 eingesetzt sind. Der Körper 1 besteht aus durchsichtigem Polycarbonat. Die Membran M1 ist eine Celluloseacetatmembran, die für Moleküle mit einem Molekulargewicht von größer als 1000 undurchlässig ist, und zwar auch in Gegenwart eines elektrischen

Feldes. Die innere Membran M2 ist eine einfache Cellulosemembran mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$. Der zwischen den Membranen M1 und M2 definierte und abgegrenzte Raum dient als Falle 2 für die zu eluierenden Makromoleküle. Nach axial außen ist die Falle 2 durch eine Trennwand 3 begrenzt, die einstückig aus dem Körper 1 ausgeformt ist. In der Trennwand 3 ist eine relativ große Öffnung 4 vorgesehen, die die freie Verbindung zwischen der Falle 2 und der Umgebung gewährleistet. Speziell öffnet sich die Öffnung 4 in eine Ausnehmung oder Vorkammer 5, die nach oben offen ausgeschnitten und axial zur Stirnseite des Körpers 1 über eine Bohrung geöffnet ist, die ein Innengewinde 6 aufweist. Diese Vorkammer 5 ist vorzugsweise während des Betriebes der Apparatur mit Luft gefüllt. Zu diesem Zwecke muß die Spannhülse 7 mit dem Außengewinde dergestalt geformt sein, daß nach dem Einschrauben in das Innengewinde 6 Wasserdichtigkeit nach außen, also in die Vorkammer 5 hinein, erreicht wird. In die Spannhülse 7 ist axial innen ein Spannrahmen 8 eingesteckt und aufgesteckt, der an den Seitenwänden 9, 10 der Vorkammer 5 gegen Verdrehen gesichert geführt ist. Der Spannrahmen 8 besitzt eine umlaufende Dichtungs-Schneidkante, die in ihrem lichten Durchmesser etwas größer ist als der Durchmesser der Öffnung 4. Schraubt man die Spannhülse 7 mit eingesetztem Spannrahmen 8 in den Körper 1 ein, so wird der Spannrahmen 8 auf die Trennwand 3 zu geführt. Dabei wird die von oben eingesetzte Membran M1 fest und die Öffnung 4 dichtverschließend zwischen dem Spannrahmen 8 und der Trennwand 3 eingespannt. Mithilfe der Dichtungs-Schneidkante 21 wird hier die Membran M1 selbst als Dichtung eingesetzt.

Eine mit der Öffnung 4 fluchtende Öffnung 12 im Spannrahmen 8 gewährleistet den freien Stromfluß durch die Membran M1 hindurch. Die Öffnung 12 im Spannrahmen sowie die abschließende Öffnung 21 in der Spannhülse bilden einen

zylindrischen Kanal (Fig. 2) oder erweitern sich vorzugsweise nach außen konisch (Fig. 5) und verhindern so das Hängenbleiben von Gasblasen vor der Membran M1. In das Innengewinde 6 ist die Spannhülse 7 mit Außengewinde einschraubbar, in die axial innen teleskopartig der Spannrahmen 8 eingesteckt und aufgesteckt ist, der an den Seitenwänden 9,10 (Fig. 1) der Vorkammer 5 gegen Verdrehung gesichert geführt ist. Durch Einschrauben der Spannhülse 7 wird der Spannrahmen 8 auf die Trennwand 3 zu geführt bzw. auf diese gezwungen. Dabei ist die von oben in die Vorkammer 5 einsetzbare äußere Membran M1 fest und die Öffnung 4 dicht verschließend zwischen dem Spannrahmen 8 und der Trennwand 3 eingespannt. Die Dichtheit dieser Einspannung kann durch zusätzliche Dichtungsringe 11 verbessert werden. Eine mit der Öffnung 4 fluchtende Öffnung 12 im Spannrahmen 8 gewährleistet den freien Stromfluß durch die Membran M1 hindurch. Durch das Freihalten der Vorkammer 5 von Flüssigkeit läßt sich die Dichtheit der Fall 2 zur Vorkammer 5 optimal überwachen und läßt sich die Ausbildung von Kriechstrompfaden ausschließen.

Nach axial innen ist die Grenze der Falle 2 durch eine nach oben offene U-förmige Schlitznut 13 festgelegt, in die die innere Membran von oben her einsteckbar ist. Die U-förmige Schlitznut 13 ist dabei sowohl in den Seitenwänden 14,15 als auch in der Sohle 16 des Kanals 17 ausgebildet.

Die Membran M2 ist mit einem rahmenartigen Randbereich versehen, der in trockenem Zustand paßgenau in die Schlitznut 13 einsetzbar ist. Beim Einbringen von Elutionsmedium in den Kanal 17 quillt der Rahmen der Membran M2 auf, so daß die Membran in der Schlitznut 13 mit hermetisch dichtem Preßsitz gehalten ist.

Zwischen den beiden inneren Membranen M2 ist ein Abschnitt des durchgehenden Kanals 17 durch diese Membranen abgetrennt, der als Elutionskammer 18 dient. Einerseits steht die Elutionskammer 18 über die Membranen M1 und M2 und die Öffnungen 4 und 12 elektrisch mit dem Außenelektrolyt der Elektrophoresekammer in Verbindung, ist andererseits jedoch hydrodynamisch und chemisch von der Umgebung soweit abgetrennt, daß die Elutionskammer 18 durchaus mit einem Elektrolyt oder Puffer gefüllt werden kann, der eine wesentlich andere Zusammensetzung als der in der Elektrophoresekammer verwendete Elektrolyt hat.

Zum Betrieb wird das zu eluierende Gelstück, das die Makromoleküle enthält, in die Elutionskammer 18 des Elektroelutionsgerätes eingelegt. Die beiden Fallen 2 und die Elutionskammer 18 werden dann mit einem stark verdünnten Puffer oder mit destilliertem Wasser gefüllt, und zwar in der Weise, daß der Spiegel 19 (Fig. 3) des eingefüllten Mediums dicht unterhalb des Oberkante 20 (Fig. 2) der Kammer 18 bzw. des Körpers 1 steht. Das Gerät wird dann in eine horizontale Elektrophoresekammer eingesetzt, die so weit mit Pufferlösung gefüllt wird, daß der Spiegel der Pufferlösung in der Elektrophoresekammer zumindest im wesentlichen gleichhoch wie der Spiegel 19 in der Elutionskammer steht. Dabei kann jedoch die Konzentration der Pufferlösung in der Elektrophoresekammer wesentlich größer, in der Regel 10 bis 100 mal größer, als die Konzentration des Puffers im Elutionsmedium sein.

Das Elektroelutionsgerät wird dabei weiterhin so in die Elektrophoresekammer eingesetzt, daß das in der Elektrophoresekammer erzeugbare elektrische Feld zumindest im wesentlichen parallel zum Kanal 10 verläuft. Dies ist schematisch in der Fig. 3 dargestellt. Dabei bedeuten in der Darstellung der Fig. 3 die mit einem großen Kreis umgebenen Minuszeichen negativ geladene Makromoleküle, während die mit einem kleinen Kreis umgebenen Pluszeichen und Minuszeichen die Pufferionen bedeuten. In Gegenwart

des elektrischen Feldes, dessen Polung in der aus Fig. 3 ersichtlichen Weise vorgenommen sei, wandern die Ionen in die in der Fig. 3 durch kurze Pfeilspitzen dargestellten Richtungen, nämlich die positiven Pufferionen zum negativen Pol und die negativen Pufferionen und die negativ geladenen Makromoleküle zum positiven Pol des einwirkenden elektrischen Feldes. Dabei treten sämtlich negativ geladenen Teilchen durch die Membran 2 hindurch in die Falle 2 ein. Während dann jedoch unter der Einwirkung des Feldes die negativ geladenen Pufferionen auch durch die äußere Membran M1 hindurchtreten und dadurch in den Puffer der Elektrophoresekammer übergehen, werden die elektrisch geladenen Makromoleküle auf der axial innenliegenden Oberfläche der äußeren Membran M1 zurückgehalten.

Auf diese Weise werden allmählich alle elektrisch geladenen Makromoleküle auf der Membran M1 gesammelt. Nach Abschluß der Elution und Überführen aller elektrisch geladener Makromoleküle aus der Elutionskammer 18 in die Falle 2 wird das Feld für ca. 10 bis 15 s umgepolt, so daß die auf der äußeren Membran M1 gesammelten Makromoleküle freigegeben werden und in die Falle 2 hineinwandern. Von dort können sie beispielsweise mit einer Mikropipette mühelos von oben in hoher Konzentration entnommen werden.

Das Volumenverhältnis zwischen jeder einzelnen Falle 2 und der Elutionskammer 18 beträgt ungefähr 1:100. Da die Falle 2 jedoch nicht so schmal ausgebildet werden darf, um nicht mehr beispielsweise mit einer Pipette zugänglich zu sein, wird die Volumenverminderung in der aus Fig. 2 ersichtlichen Weise durch eine Anhebung der Sohle oder des Bodens der Falle 2 gegenüber der Sohle der Elutionskammer 18 bewirkt.

Alternativ kann das Volumen der Falle durch die aus den Figuren 4 und 5 erkennbaren Maßnahmen verkleinert werden, nämlich dadurch, daß die Falle 2 mit rundem Querschnitt und sich nach unten konisch verjüngend ausgebildet ist.

Das in den Figuren 4 und 5 dargestellte weitere Ausführungsbeispiel des Elektroelutionsgerätes unterscheidet sich von dem in den Figuren 1 und 2 gezeigten Gerät weiterhin dadurch, daß der durch die Öffnung 12 im Spannrahmen 8 und das Innere der Spannhülse 7 definierte Kanal 21 stufenlos und glattwandig sich nach außen öffnend ausgebildet ist. Dadurch wird verhindert, daß sich im Kanal 21 Gasblasen bilden oder festsetzen und dadurch die elektrischen Stromverhältnisse verändern.

Außerdem ist bei dem in Figur 5 gezeigten Spannrahmen 8 eine Schneidringkante 22 ausgebildet, die die Membran M3 gegen die Außenseite der Trennwand 3 dichtend zwingt.

Nummer:
 Int. Cl.³:
 Anmeldetag:
 Offenlegungstag:

33 37 669
 B 01 D 13/02
 17. Oktober 1983
 2. Mai 1985

CIS-G.

FIG. 1

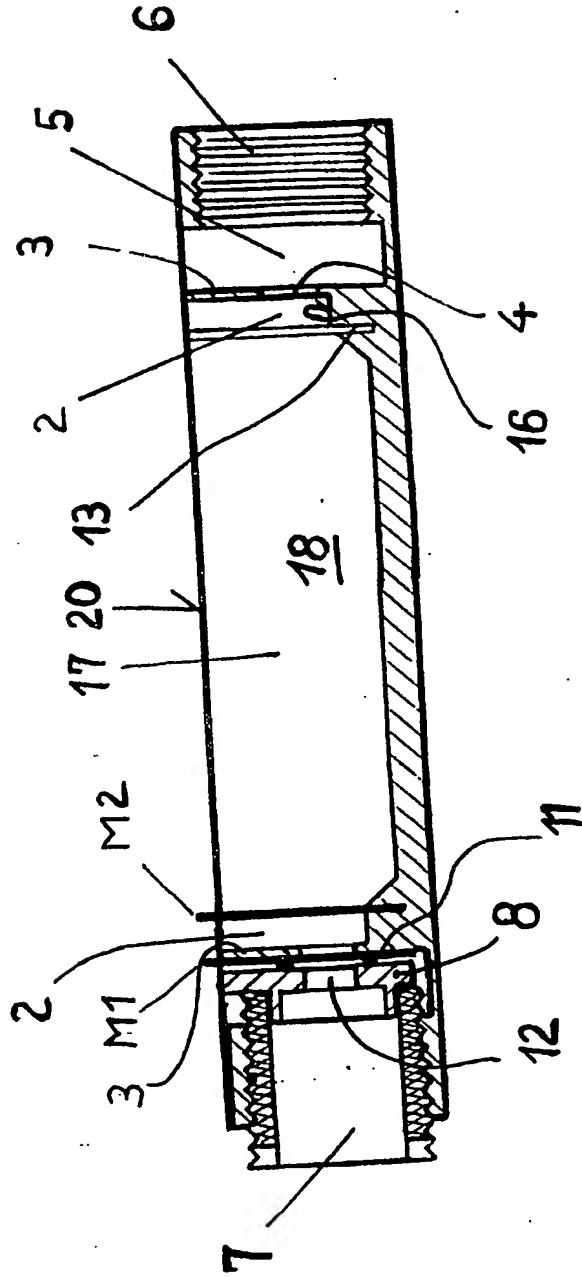
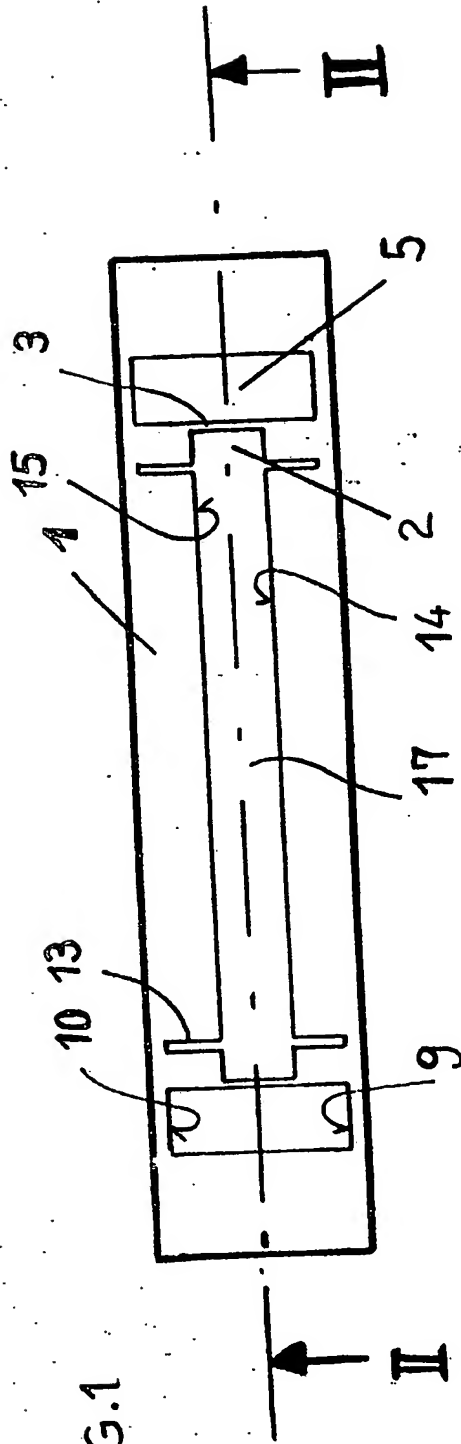


FIG. 2

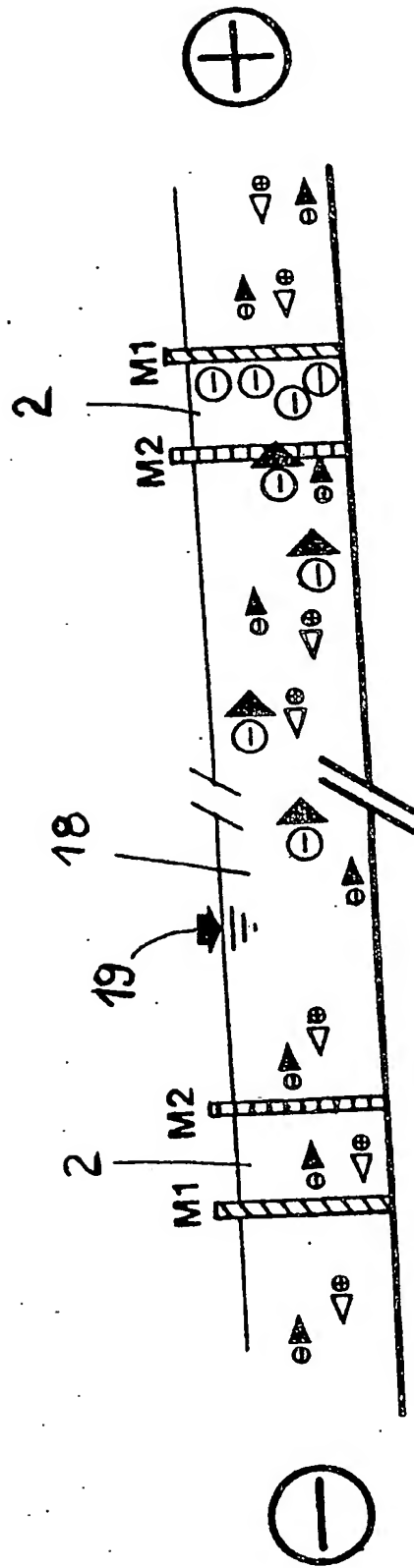


FIG.3

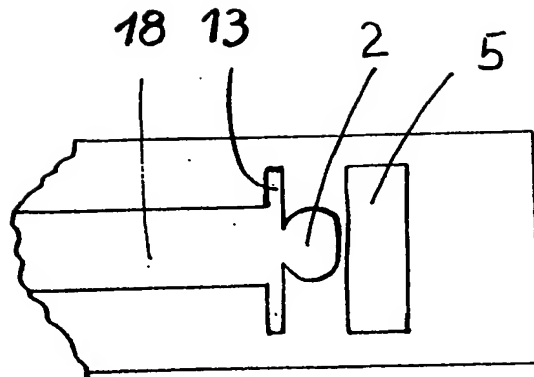


FIG. 4

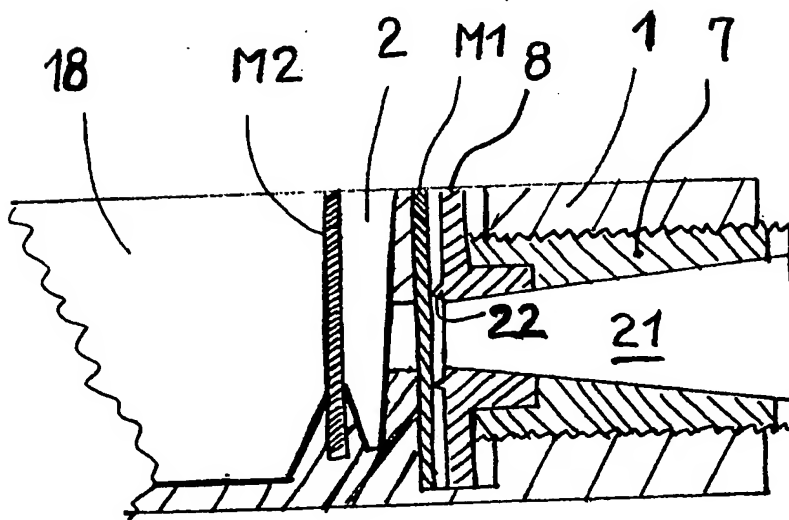


FIG. 5